第43卷 第3期
2000年8月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.43, No.3
Aug., 2000

文章编号：0454-6296（2000）03-0227-06

松针瘿蚊越冬幼虫体内酶活性的时序变化

李毅平[1]，龚 和[1]，朴镐用[2]

（1. 中国科学院动物研究所，农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080；
2. 韩国科学技术院生命工学所昆虫资源室，韩国大田 305-600）

摘要：昆虫的越冬耐寒过程与糖酵解、磷酸己糖途径和抗冻保护性物质合成等一些中间代谢有关的酶有关。该文对松针瘿蚊 *Thecodiplosis japonensis* 老熟幼虫1998/1999越冬期间体内上述代谢酶活性的变化进行了研究。越冬期间体内糖原磷酸化酶活性明显地增加，糖酵解有关的酶（己糖激酶、乳酸脱氢酶和醛缩酶）活性较低，以保证更多的碳源（糖原）转化成海藻糖。越冬期间，体内葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性增高所产生的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH），可为细胞在亚低温状态下发挥正常功能以及体内抗冻保护性物质的合成提供还原动力，同时通过调节体内海藻糖酶活性来维持越冬期间较高含量的海藻糖和移除春季体内累积的过多的海藻糖。

关键词：日本松针瘿蚊；中间代谢；酶活性；避免结冰昆虫；越冬幼虫
中图分类号：Q966；Q956 **文献标识码**：A

越冬昆虫为了顺利的越冬，一般可以通过越冬耐寒锻炼提高其对低温和亚低温的耐受性，这种低温锻炼过程包括：抗冻保护性物质（如甘油、海藻糖、山梨醇和肌醇）在体内的累积；冰核介质（ice nucleating agent，包括冰核蛋白 ice nucleating protein）和抗冻蛋白（antifreeze protein，或称热滞蛋白 thermal hysteresis protein）含量和活性的调节等方面来灵活地调节虫体的过冷却点（supercooling point）、适当的体内降温速度等达到安全越冬的目的[1~3]。根据越冬昆虫体内是否存在冰晶，将其分为两大越冬对策类型：避免结冰昆虫（freeze-avoiding insect）和忍耐结冰昆虫（freeze-tolerant insect）[1,3,4]。两种越冬对策的昆虫越冬机制有许多不同点：避免结冰昆虫通过移除体内的冰核介质/蛋白来降低虫体的过冷却点，同时通过合成抗冻蛋白来稳定体内的过冷却状态；忍耐结冰昆虫通过产生或活化体内潜在的冰核介质/蛋白诱导细胞外冰晶的形成，同时也可通过体内合成的抗冻蛋白抑制冰晶的重结晶。但两种对策的越冬昆虫有一个共同的越冬机制，即通过体内累积较高含量的抗冻保护性物质——低分子量的糖和多元醇[2~7]。而这些抗冻保护性物质是通过降解越冬昆虫脂肪体内所储存的糖原，在较低的温度下通过诱导和调节体内一系列中间代谢有关的酶来合成的。这些抗冻保护性物质可能通过保护生物膜结构的完整性和细胞器功能的整体性发挥重要的作用[8,9]。

日本松针瘿蚊 *Thecodiplosis japonensis* 是韩国林业生产的重要害虫。成虫出现在5月末到7月下旬，在6月中旬出现一个高峰；雌蚊羽化后立即交配，产卵于正生长着的松针簇间，孵化出的幼虫向松针基部缓慢移动，并在此形成虫瘿。日本松针瘿蚊幼虫在虫瘿内度过3个

基金项目：中韩国际合作项目和农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室资助项目
收稿日期：1999-08-22；修订日期：1999-11-01

龄期，发育成老熟的幼虫后从虫瘿内钻出来而掉入林地越冬[10]。该虫以3龄老熟幼虫在浅层土表采用避免结冰的对策顺利越冬。越冬季节幼虫体内累积较高含量的海藻糖和携脂蛋白以及高活性的抗冻蛋白[5,11]。

越冬季节昆虫对低温和亚低温下的生态适应机制已有详尽的研究报道，但对越冬昆虫的生理适应机制，尤其是对参与抗冻保护性物质合成的中间代谢途径有关的酶研究甚少。

本文首次报道日本松针瘿蚊幼虫越冬期间体内参与抗冻保护性物质（海藻糖）合成有关的中间代谢有关酶的变化动态，阐明松针瘿蚊越冬幼虫体内存在明显的代谢补偿和灵活的代谢重组机制，使其顺利越冬。

1　材料与方法

1.1　试剂

所有生化试剂和偶联酶均购自Sigma公司或Boehringer-Mannheim公司。

1.2　供试虫源

松针瘿蚊3龄越冬幼虫采自1998/1999越冬季节的不同时期（12月中旬至次年的4月上旬）。幼虫采集分两种方法，12月中下旬幼虫直接采自剖开的虫瘿，收集到的幼虫直接置于－73℃的低温冰箱冷冻保存，待用。1月后的幼虫按李毅平等[12]方法收集。

1.3　粗酶液的制备

从低温冰箱取出的不同越冬时期的适量整体幼虫，放在匀浆器中，按1∶10（w/v）加入预冷的咪唑缓冲液（pH7.2，20 mmol/L 咪唑，5 mmol/L EGTA，5 mmol/L EDTA，10 mmol/L β-巯基乙醇，50 mmol/L 氟化钠，0.1 mmol/L PMSF），匀浆。匀浆液在26 000×g，4℃下离心20 min。取上清液，经Sephadex G-25柱（1 cm×5 cm）或Pharmacia HiTrap® 柱（5 mL）脱盐，所得到的滤出液作为酶液。对于糖原磷酸化酶（GPase）活力的测定，将上述匀浆液静置后，所得到的上清液，不经离心直接作为酶液进行测定。

1.4　酶活力的测定

所有的酶活力测定均在室温（25℃）下在日本Milton 3000双光束紫外分光光度计下进行。设置非专一性酶活力（在缺少底物或酶液情况下）为对照。一个酶活力单位定义为25℃下每分钟转化1 μmol底物所需要的酶量。

各种酶活力的最佳测定条件参照Joanisse和Storey[13,14]的方法，具体条件如下：

糖原磷酸化酶：①总活力（$a+b$）：50 mmol/L 磷酸缓冲液（pH7.0），4 mg/mL 糖原，5 μmol/L 葡萄糖-1，6-二磷酸，0.2 mmol/L $NADP^+$，2 mmol/L AMP，15 mmol/L 硫酸镁，1 IU 葡萄糖磷酸变位酶，1 IU 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。②活性形式（a）：上述条件下，不加AMP。己糖激酶：20 mmol/L 磷酸缓冲液（pH7.2），2 mmol/L 葡萄糖，2 mmol/L ATP，0.5 mmol/L $NADP^+$，10 mmol/L 硫酸镁，过量的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶：20 mmol/L 咪唑缓冲液（pH7.2），1 mmol/L 葡萄糖-6-磷酸，0.2 mmol/L $NADP^+$，5 mmol/L硫酸镁。乳酸脱氢酶：20 mmol/L 咪唑缓冲液（pH7.2），2 mmol/L 丙酮酸，0.15 mmol/L NADH。醛缩酶：20 mmol/L 咪唑缓冲液（pH7.2），0.1 mmol/L果糖-1，6-二磷酸，0.15 mmol/L NADH，过量的丙糖磷酸异构酶和甘油-3-磷酸脱氢酶。海藻糖酶：酶活

性的测定参照 Sato 等[15]的方法。粗酶液同底物缓冲液［50 mmol/L 磷酸缓冲液（pH7.5），0.133 mol/L α，α-海藻糖］在 25℃下30 min，然后将反应混合液在沸水浴中加热 4 min，反应所释放出的葡萄糖按 Sigma 公司的 Trinder Glucose Kit 测定。

蛋白质测定：参照 Bradford[16]方法。

所有酶活力测定设 3～5 次重复，数据以平均数 ± 标准偏差（$M \pm SD$）表示。

2　结果分析

昆虫越冬耐寒过程与中间代谢的一些酶有关，这些酶包括糖酵解、磷酸己糖途径和抗冻保护性物质合成等一些中间代谢途径有关的酶。通过代谢途径的重新调整，从而使越冬昆虫获得对低温或亚低温的耐受能力。

松针瘿蚊越冬幼虫抗冻保护性物质（海藻糖）的积累是经动用体内贮存的糖原而来的。糖原降解成抗冻保护性物质是依赖于糖原磷酸化酶的活性。糖原磷酸化酶总活力从 12 月中旬的 6.48 U/g 湿重到 12 月下旬的 9.75 U/g 湿重，明显增加。这种高活力一直持续到 3 月中旬的 9.71 U/g 湿重。越冬期间，糖原磷酸化酶的活性形式（a%）占总活力很高的百分比（图 1）。越冬期间糖原磷酸化酶的激活可保证更多的由糖原而来的碳源往海藻糖合成途径转变。己糖激酶是一个由单糖（六碳糖）进入糖酵解途径的酶，也是越冬后期海藻糖的分解产物——葡萄糖转化为其它代谢能源的一个关键酶。图 1 表明：己糖激酶活力保持在一定水平（大约 7.48 U/g 湿重）直到 1 月份，接着酶活力急剧下降到 2 月中旬的最低水平（1.47 U/g 湿重），说明采用单糖（如葡萄糖）合成抗冻保护性物质的能力极小；越冬后期，酶活力重新返回到较高水平，达到 7.50 U/g 湿重，活力的提高有利于将由海藻糖降解而来的葡萄糖转化为其它生理活动所需的能量。

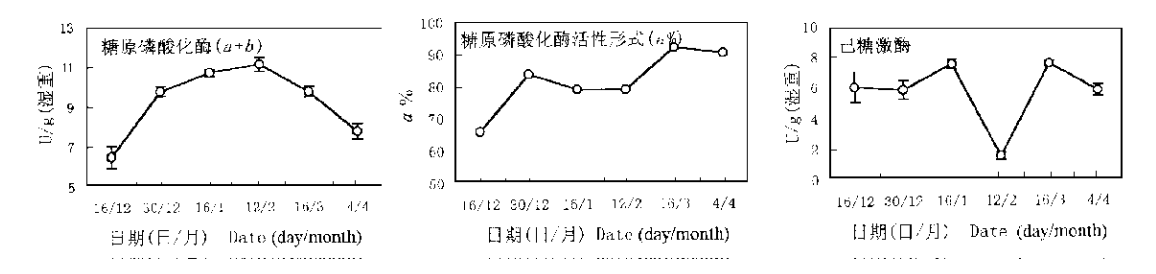


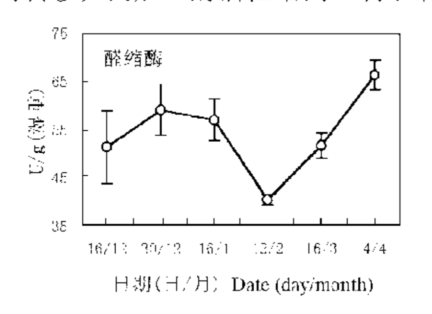
图 1　越冬期间日本松针瘿蚊幼虫整体糖原磷酸化酶（总活力 $a + b$ 和活性形式 a%）和己糖激酶酶活力变化

Fig. 1　Seasonal profiles of activities of glycogen phosphorylase (GPase) and hexokinase in whole-body of overwintering *T. japonensis* larvae. For GPase, both total activity ($a + b$) and active form (a%) are shown

酶活性以酶活性单位/克虫体湿重（U/g 湿重）表示。每一个数据点代表 3～5 次实验的平均值，棒的大小代表其标准偏差。图 2～图 4 相同

Activities are shown as units/g wet weight. every data is indicated as mean ± standard deviation ($M \pm SD$) for $n = 3 \sim 5$ samples. Fig. 2～Fig. 4 are the same as Fig. 1

图2是与糖酵解有关的二个关键酶：醛缩酶和乳酸脱氢酶，由糖原转化成海藻糖依赖于它们的相对活力。由图可看出：醛缩酶活力保持在约55.00 U/g湿重水平直到1月，接着下降到2月的最低水平（40.38 U/g湿重），最后返回到较高水平。乳酸脱氢酶的活力从越冬前期就显著下降到1月的2.60 U/g湿重，接着持续增加到4月的10.60 U/g湿重，而达到越冬前期水平。这二个酶显示相同变化模式，即越冬早期糖酵解受抑制，利于更多的碳源往海藻糖合成方向转移；而后，酶活性增高，利于清除体内累积的抗冻保护性物质（海藻糖）。



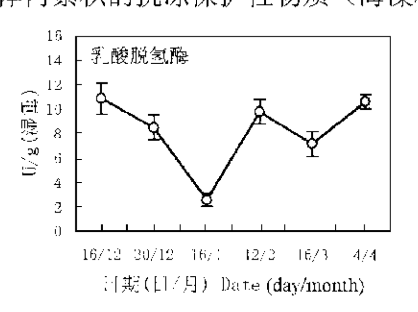


图2 越冬期间日本松针瘿蚊幼虫整体醛缩酶和乳酸脱氢酶酶活力变化

Fig. 2 Seasonal profiles of activities of aldolase and lactate dehydrogenase in whole-body of overwintering *T. japonensis* larvae

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是由磷酸己糖支路产生还原动力还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）的首要的关键酶。图3表明：该酶由越冬前期的0.61 U/g湿重显著增加到1月中旬的1.22 U/g湿重，后持续达到2月的2.02 U/g湿重，最后显著下降到0.08 U/g湿重，直到4月。海藻糖的合成需要一定的由NADPH所提供的还原环境，使细胞在亚低温下仍保持正常功能，同时NADPH也是合成抗冻保护性物质所必须的。

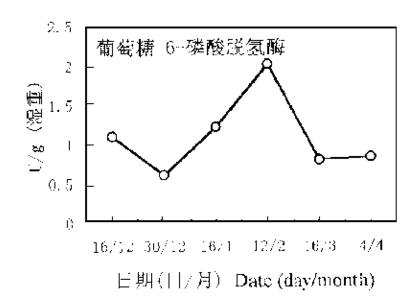


图3 越冬期间日本松针瘿蚊幼虫整体葡萄糖-6-磷酸脱氢酶酶活力变化

Fig. 3 Seasonal profile of activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in whole-body of overwintering *T. japonensis* larvae

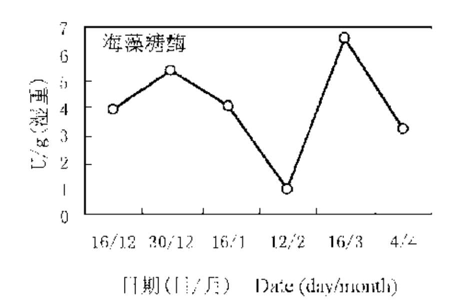


图4 越冬期间日本松针瘿蚊幼虫整体海藻糖酶酶活力变化

Fig. 4 Seasonal profile of activity of trehalase in whole-body of overwintering *T. japonensis* larvae

海藻糖酶能降解海藻糖成葡萄糖。由图4可看出，越冬前期酶活力逐渐下降，直到越冬中期的最低水平（1.00 U/g湿重），即幼虫体内海藻糖含量最高的时期；越冬后期，酶活力

开始反弹到较高水平，有利于移除体内过量的海藻糖。

3 讨论

冬季，低温来临前，具有耐寒能力的越冬松针瘿蚊幼虫必须启动一些对冬季所遇到的致死的低温和亚低温伤害所需的生理生化适应机制：体内累积较高含量的海藻糖、合成高热滞活性的抗冻蛋白和获得快速冷耐受能力等机制[1,2,5,17]。

体内海藻糖的合成是在一系列与中间代谢有关酶的调控下进行的。海藻糖是由体内脂肪体所贮存的糖原转化而来。图 1 表明这种转化是在高活性的糖原磷酸化酶参与下实现的，酶活性的时序变化与海藻糖累积的趋势有一致性[5]：越冬期间，总糖原磷酸化酶和活性形式均保持在高水平上，有利于更多的碳源转化成海藻糖。

海藻糖的大量合成是以大量的碳源为基础的，为此必须抑制消耗碳源的另一个代谢途径。日本松针瘿蚊越冬幼虫体内与糖酵解途径有关的酶活性变化趋势很好地说明了这点（图 2）：当大量合成海藻糖时，同其它象积累山梨醇的越冬昆虫一样，醛缩酶和乳酸脱氢酶表现较低的活力；相反，当须清除体内积累的海藻糖时，则表现较高的活力[13,14]。

同时海藻糖的合成也需要一定的还原环境，这主要是由磷酸己糖支路的第一个关键酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶所产生的 NADPH 来提供。越冬的低温环境下，该酶仍保持很高活性，不但有利于提供细胞还原状态，也有利于低温下抗冻保护性物质合成（图 3）。

海藻糖是日本松针瘿蚊越冬幼虫重要的抗冻保护性物质[5]。海藻糖酶在调节其体内含量有着十分重要的作用：在越冬的早中期，抑制该酶活性，维持体内海藻糖较高含量；越冬后期，激活该酶，清除体内积累的海藻糖（图 4）。采用海藻糖酶来调节体内海藻糖含量是一种十分经济的调节方式。

参 考 文 献 （References）

[1] 李毅平，龚　和. 昆虫低温生物学：Ⅰ. 昆虫耐冻的生理生化适应机制. 昆虫知识，1998，35（6）：364～368

[2] Lee R E. Principles of insect low temperature tolerance. In：Lee R E，Denlinger D L eds. Insect at Low Temperature. New York：Chapman & Hall，1991. 17～46

[3] Bale J S. Insect cold hardiness：Freezing and supercooling—An ecophysiological perspective. J. Insect Physiol.，1987，33：899～908

[4] Bale J S. Classes of insect cold hardiness. Funct. Ecol.，1993，7：751～753

[5] 李毅平. 昆虫耐寒的生化及分子机理. 北京：中国科学院动物研究所博士学位论文. 1999

[6] Lee R E，Denlinger D L. Cold tolerance in diapausing and non-diapausing stages of the flesh fly，*Sarcophaga crassipalpis*. Physiol. Entomol.，1985，10：309～315

[7] Storey K B，Storey J M. Biochemical adaptations for winter survival in insects. In：Steponkus P L ed. Advances in Low-Temperature Biology，Vol. 1. London：JAI Press，1992. 101～140

[8] Rojas R R，Charlet L D，Leopold R A. Trehalose accumulation in the overwintering larvae of the long-horned sunflower girdler，*Dectes texanus*. Cryo-Letters，1994a，15：34～398

[9] Rojas R R，Charlet L D，Leopold R A. Biochemistry and physiology of overwintering in the mature larvae of the sunflower stem weevil，*Cylindrocopturus adspersus*（Coleoptera：Curculionidae）in the northern great plains. J. Insect Physiol.，1994b，40：201～205

[10] Ko J H. The present status of damage and control of pine gall midge in Korea. Korean J. Plant Protection, 1982, 21: 159～162

[11] 李毅平，龚 和，朴镐用. 越冬松针瘿蚊幼虫整体携脂蛋白的分离和纯化. 昆虫学报，2000，43（增刊）：77～84

[12] Li Y P, Gong H, Park H Y. Physiological and biochemical mechanisms of temperature shocks on overwintering mature larvae of pine needle gall midge *Thecodiplosis japonensis* (Diptera: Cecidomyiidae). Entomologia Sinica, 1999, 6: 313～321

[13] Joanisse D R, Storey K B. Enzyme activity profiles in an overwintering population of freeze tolerant larvae of the gall fly, *Eurosta solidaginis*. J. Comp. Physiol. B, 1994a, 164: 247～255

[14] Joanisse D R, Storey K B. Mitochondrial enzymes during overwintering in two species of cold-hardy gall insects. Insect Biochem. Molec. Biol., 1994b, 24: 145～150

[15] Sato K, Komoto M, Sato T *et al*. Baculovirus-mediated expression of a gene for trehalase of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, in insect cells, SF-9, and larvae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. Insect Biochem. Molec. Biol., 1998, 27: 1 007～1 016

[16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 1976, 72: 248～254

[17] Li Y P, Gong H, Park H Y. Characterization of the rapid cold-hardening response in overwintering mature larvae of the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis*. Cryo-Letters, 1999, 20: 383～392

Profile of enzymic activity in overwintering mature larvae of the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis*

LI Yi-ping[1], GONG He[1], Park Ho-Yong[2]

(1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;
2. Insect Resources Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea)

Abstract: Insect cold hardening processing is related with the activity of some enzymes of intermediary metabolism, including enzymes of glycolysis, hexose monophosphate shunt and cryoprotectant synthesis. In this study, overwintering larvae of pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis*, were sampled at various dates over 1998～1999 winter and the profile of enzymic activity of intermediary metabolism was studied. The increased glycogen phosphorylase during overwintering ensured the required flow of carbon into the synthesis of trehalose. Enzymes of glycolysis (hexokinase, lactate dehydrogenase, aldolase) showed low activities during overwintering when more carbon flowing into trehalose synthesis. The glucose-6-phosphate dehydrogenase increased during overwintering, indicating that reduced condition of cell might keep the cell in proper function even in cold temperature, and also for cryoprotectant synthesis. The changes in trehalase activity showed that low activity was for keeping higher trehalose content and high activity for removing it in the spring.

Key words: *Thecodiplosis japonensis*; intermediary metabolism; enzyme activity; freeze-avoiding insect; overwintering insect